重组保幼激素酯酶的纯化和生物学效应

章东方

（中国科学技术大学生命科学学院，合肥 230036）

摘要：培养昆虫细胞生产重组昆虫保幼激素酯酶时细胞培养液的蛋白质浓度为153.2～188.0 μg/mL。批量处理纯化重组保幼激素酯酶时酶蛋白活力回收率33%，效果与梯度分离方法相当，但简便快速，可作为大量分离纯化的第一步。重组保幼激素酯酶对烟草天蛾 *Manduca sexta* 幼虫的生物学活性测定结果验证了重组保幼激素酯酶对烟草天蛾幼虫和自身天然酶有相似的生物学活性。

关键词：重组保幼激素酯酶；生物测定；烟草天蛾；离子交换层析

中图分类号：Q965 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2002)06-0743-05

Purification and biological effects of a recombinant juvenile hormone esterase

ZHANG Dong-Fang（School of Life Sciences，University of Science and Technology of China，Hefei 230026，China）

Abstract: The protein concentrations of cell supernatants infected with recombinant AcNPV（*Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus）containing wild type or mutant juvenile hormone esterase were between 153.2－188.0 μg/mL. The enzyme activity recovery rate was about 33%. The stepwise purification of the enzyme had similar results as the gradient method，but was more convenient for handling large volumes of cell supernatants. The cuticle blackening test showed that the recombinant juvenile hormone esterase from *Heliothis virescens* had biological effects on tobacco horn moth larvae（*Manduca sexta*）.

Key words: recombinant juvenile hormone esterase；biological assay；*Manduca sexta*；ion exchange chromatography

昆虫保幼激素是倍半萜烯类化合物，由昆虫的咽侧体分泌，具有调节昆虫生长发育的作用。幼虫在蜕皮激素诱导下蜕皮时，保幼激素阻止幼虫变态。在成虫阶段，保幼激素刺激脂肪体细胞合成卵黄原蛋白和卵母细胞摄取卵黄原蛋白。昆虫体内保幼激素的含量受其合成和降解代谢双重调节。保幼激素含量的下降导致幼虫蜕皮变态。昆虫保幼激素酯酶（juvenile hormone esterase，JHE）是降解保幼激素的关键酶之一（Hammock，1985；Jones，1995；Staal，1989）。保幼激素酯酶由脂肪体细胞和上皮细胞产生。理论上人为地增加昆虫体内保幼激素酯酶的浓度时会导致保幼激素浓度下降，从而使受影响的昆虫停止取食。为了深入了解昆虫保幼激素酯酶的生物学功能，以及功能和结构之间的关系，从烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* 中分离获得了编码保幼激素酯酶基因的 cDNA 文库（Hanzlik *et al*.，1989），并把该基因编码片段（Hammock *et al*.，1990）和突变的基因片段（Bonning *et al*.，1997）分别插入到苜蓿银纹夜蛾核多角体病毒（*Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus，AcNPV）基因组，获得了重组的昆虫杆状病毒。保幼激素酯酶基因在感染病毒的昆虫培养细胞中大量表达保幼激素酯酶，并分泌到培养液中。用亲和层析（Abdel-Aal and Hammock，1986）和离子交换层析（Ichinose *et al*.，1992）获得了部分纯化的保幼激素酯酶。烟草天蛾 *Manduca sexta* 幼虫体色变黑是一种检测化学药剂抗保幼激素效果的灵敏方法，已经用于天然保幼激素酯酶和重组病毒表达的保幼激素酯酶的生物活性测定（Philpott and Hammock，1990）。

本文作者报道用含保幼激素酯酶基因的重组杆状病毒感染昆虫培养细胞，从培养细胞上清液中分离纯化保幼激素酯酶的快捷方法，并测定了重组保幼激素酯酶对不同昆虫在生长发育时的早熟作用。

基金项目：安徽省自然科学基金项目（98113403）；美国加州大学生物技术研究和教育专项资助项目

作者简介：章东方，男，1961年12月生，博士，研究员，现从事昆虫病毒和分子生物学研究，E-mail：dfzhang@mail.ustc.edu.cn

收稿日期 Received：2001-02-19；接受日期 Accepted：2002-03-26

1 材料和方法

1.1 试虫来源

烟草天蛾卵和人工饲料由 Carolina Biological Supplies Co. 提供。在 28℃、光照 14 h 条件下饲养，隔天更换饲料。

1.2 重组保幼激素酯酶的生产

来源于莎草夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 的 SF21 细胞系用于病毒增殖和空斑实验法定量测定病毒数量。来源于粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* 的 T. ni 细胞系用于生产保幼激素酯酶。SF21 细胞系用 Excell 401（JRH Biosciences，Woodland，CA）培养液在 27℃下摇瓶培养。细胞培养液中加 3%胎牛血清，青霉素、链霉素各 100 单位/mL。摇瓶转速为 80 r/min。*T. ni* 细胞系用 Excell 405（JRH Biosciences，Woodland，CA）细胞培养液在 27℃下摇瓶培养。细胞培养液中加青霉素、链霉素各 100 单位/mL，不加胎牛血清，摇瓶转速为 100 r/min。用 5 PFU（空斑形成单位）/细胞含保幼激素酯酶基因的重组苜蓿银纹夜蛾核多角体病毒（简称 Ac. JHE 病毒）或基因突变体重组病毒（简称 KK. JHE 病毒）分别感染 T. ni 细胞（5×10^5 细胞/mL），27℃下摇瓶培养 3 天，多于 95%的保幼激素酯酶以糖基化的形式分泌到培养基中。离心培养细胞，收取上清液，-80℃保存备用。

1.3 重组保幼激素酯酶的纯化

DEAE-Sepharose 离子交换层析。按供应商说明书装填层析柱。保幼激素酯酶细胞培养上清液 125 mL 用 pH 8.5 Tris-HCl 缓冲液 1:2 稀释后上柱，然后用 5 倍体积 pH 8.5 Tris-HCl 缓冲液洗胶，再用 5 倍体积的 pH 7.5 Tris-HCl 缓冲液洗去杂蛋白，用 pH 7.5 含 100 mmol/L 和 200 mmol/L NaCl 的 Tris-HCl 缓冲液分步洗脱保幼激素酯酶。收集活性洗脱液，用 Centricon100（Amicon Co.）浓缩样品. -20℃短期保存备用。后续纯化采用 HPLC-mono Q 柱层析和 S-100 分子筛过滤。

保幼激素酯酶体外酶活性用^{3}H 有机溶剂分离测定法（Hammock and Sparks，1977）或分光光度法（McCutchen *et al*.，1993）。分光光度法测定保幼激素酯酶体外活力的步骤为：96 孔板孔内加入含 10%蔗糖、50 mmol/L（pH 7.4）PBS 缓冲液 276 μL，2.25%艾伦试剂 DTNB［5,5'-Dithiobis（2-Nitrobenoic acid)］2 μL，酶反应底物 1-庚烷基硫代乙酸甲硫酯 2 μL，待测酶样品 20 μL，用酶标仪在 405 nm 波长处测定酶活力。该方法用于保幼激素酯酶纯化过程中检测收集有酶活性组分。^{3}H 有机溶剂分离测定法用于酶蛋白样品的活性标定。

蛋白质浓度测定用 Bradford 法，牛血清白蛋白为蛋白质标准。蛋白质纯度检测用 10% SDS-PAGE 凝胶电泳，考马斯亮蓝 G250 染色或银染色。用蛋白质印迹法（Western blot）检测蛋白质的完整性。

1.4 保幼激素酯酶的生物学效应试验

1.4.1 保幼激素酯酶对烟草天蛾生物活性的测定：所有被试幼虫都在 3 龄，幼虫平均体重 213.4 ± 10.3 mg。所有幼虫在实验时在头盖线开裂期（head capsule slippage）。每处理组幼虫 10 头，4 次重复。用二氧化碳麻醉后，在腹足部位用 10 μL 注射器注射不同剂量的样品。注射用样品来源于 100 mmol/L NaCl Tris-HCl 缓冲液洗脱样品，用 0.2 μm 过滤膜过滤除菌并加青、链霉素各 100 单位/mL 预防细菌和真菌感染。

对照处理组有：（1）不注射对照；（2）含 5%葡萄糖的 Tris-HCl 缓冲液（pH 7.5），5 μL；（3）65℃ 20 min 灭活的保幼激素酯酶样品，5 μL；（4）对照蛋白质样品，小牛血清白蛋白 12.5 mg/mL，25 mg/mL，4 μL。

样品处理组有：（1）重组野生型保幼激素酯酶，蛋白质含量 1.18 mg/mL，比活力 5.36 nmol/(min·mL)，5 μL；（2）赖氨酸突变体（KK. JHE）保幼激素酯酶，蛋白质含量 0.55 mg/mL，比活力 1.72 nmol /(min·mL)，5 μL；（3）重组野生型保幼激素酯酶，蛋白质含量 6.10 mg/mL，比活力 9.26 μmol /(min·mL)，5 μL；（4）重组野生型保幼激素酯酶，蛋白质含量 46 mg/mL，比活力为 4.58 μmol /(min·mL)，4 μL。

1.4.2 活性评价方法：按照 Philpott 等（1990）报道的活性评价方法，在 3 龄期注射样品后，根据幼虫进入下一龄期时体色发黑的程度进行分级。1 级，体色全黑；2 级，体色 75%黑色；3 级，体色 50%黑色；4 级，体色 25%黑色；5 级，体色正常。

2 结果

2.1 细胞表达保幼激素酯酶

5 批培养细胞上清液中，蛋白质浓度为 153.2 ~ 188.0 μg/mL。活力范围 360.8 ~ 578.1 μmol /(min·mL)（每分钟每毫升培养上清液降解保幼激素Ⅲ的微摩尔

数)，比活力为 2.29 ~ 3.09 μmol /(min·mg)（每分钟每毫克蛋白质降解保幼激素Ⅲ的微摩尔数)。说明保幼激素酯酶在培养细胞上清液中表达量较高。

2.2 DEAE-Sepharose 离子交换层析分离结果

DEAE-Sepharose 离子交换分步层析的结果见表 1。结果表明：用 100 mmol/L NaCl Tris-HCl 缓冲液的洗脱峰含有较纯的保幼激素酯酶（图 1，洗脱样品Ⅰ)，酶活力占总酶活力的 33%，保幼激素酯酶含量占总蛋白质含量的 6.0%，纯化倍数为 5.44 倍。浓缩后电泳可见较纯净的保幼激素酯酶条带，分子量约为 66 kD，与用亲和层析纯化的天然保幼激素酯酶蛋白分子量相同，蛋白质印迹实验结果也为单一条带（图 2)。说明纯化的保幼激素酯酶没有降解。该样品浓缩后用于注射幼虫进行体内生物活性测定。200 mmol/L NaCl Tris-HCl 缓冲液（50 mmol/L，pH 7.5）洗脱液中也含有保幼激素酯酶，但酶活力较低（图 1，洗脱样品Ⅱ)，可以进一步用 HPLC-mono Q 柱层析纯化。

表 1　DEAE-Sepharose 柱层析分离保幼激素酯酶结果

Table 1　Purification of juvenile hormone esterase with DEAE-Sepharose chromatography

样品 Samples	体积 (mL) Volume	总蛋白量 (mg) Total protein	酶活力 Activity [nmol /(min·mL)]	总活力 Total activity (nmol/min)	比活力 Specific activity [μmol /(min·mg)]	纯化倍数 Purification factor
细胞上清液 cell supernatants	125	27.3	294.0	36 750	1.35	
洗脱样品Ⅰ eluentⅠ	24	1.655	506.5	12 156	7.35	5.44
洗脱样品 Ⅱ eluentⅡ	40	2.134	211.5	8 458	3.96	2.93

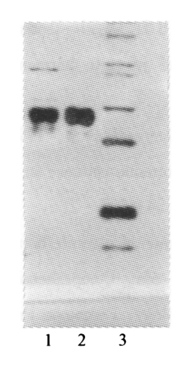


图 1　保幼激素酯酶 10% SDS-PAGE 凝胶电泳结果

Fig. 1　JHE 10% SDS-PAGE gel electrophoresis

1：保幼激素酯酶洗脱样品Ⅱ　JHE eluent Ⅱ；

2：保幼激素酯酶洗脱样品Ⅰ　JHE eluent Ⅰ；

3：NOVEX 蛋白质分子量标准　NOVEX protein molecular standards (200 kD，116.3 kD，97.4 kD，66.3 kD，55.4 kD，36.5 kD，31.0 kD)

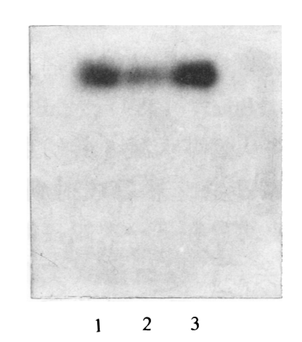


图 2　保幼激素酯酶蛋白斑点杂交结果

Fig. 2　JHE Western blot analysis

1：纯化的天然保幼激素酯酶 natural JHE sample；

2：重组保幼激素酯酶细胞上清液 cell supernatant with recombinant JHE；

3：纯化的重组保幼激素酯酶 purified recombinant JHE

2.3 纯化的保幼激素酯酶对烟草天蛾的生物活性测定结果

所有对照、处理 1 和处理 2 幼虫都在 12 ~ 24 h 内蜕皮进入 4 龄期，无体色变化。随后 10 天内幼虫都正常发育化蛹，最终羽化为成虫。

处理 3 中有 65%（26 头）幼虫蜕皮进入 4 龄时，体色发生不同程度的变黑，其余的幼虫体色正常或稍浅。4 头体色深的幼虫进入 5 龄时仍然呈斑驳状体色。所有幼虫都化蛹。

处理 4 共 10 头幼虫，5 头幼虫注射样品 12 h 后蜕皮进入 4 龄，其特征为头部深黑色，体表颜色深浅相间。3 天后进入 5 龄体色恢复正常。另外 5 头幼虫注射样品 18 h 后进入 4 龄，体色完全变黑，发育迟缓。5 天进入 5 龄，较对照晚 48 h，不活泼，取食少，幼虫不能正常发育。注射样品 15 天后死亡。

3 讨论

培养昆虫细胞生产重组昆虫保幼激素酯酶时细胞上清液中蛋白质浓度为153.2～188.0 μg/mL，离子交换层析分步纯化后保幼激素酯酶含量占总蛋白质含量的6.0%，酶活力占总酶活力的33%，纯化倍数为5.44倍。说明该表达系统表达的酶蛋白可达每升培养液60 mg，一步纯化后可获得12.5 mg酶蛋白，纯化效果与梯度分离方法相当，但简便快速，可作为大量分离纯化的第一步。为研究保幼激素酯酶在昆虫体内外的理化性质、结构与功能的关系奠定了基础。

测定保幼激素酯酶体外酶活力有^{3}H有机溶剂分离测定法（Hammock and sparks，1977）或分光光度法（McCutchen *et al*.，1993）两种方法。光谱法比较简便，有机溶剂分离法准确可靠，但要使用同位素（Zhang，2000）。本文作者在保幼激素酯酶纯化过程中采用光谱法检测收集有酶活性组分，而^{3}H有机溶剂分离测定法用于酶蛋白样品的活性标定。

体色变黑实验是测定化学药剂拮抗保幼激素活性的常用方法（Staal，1989）。Philpott和Hammock用亲和层析方法从烟草天蛾5龄幼虫血淋巴中纯化出天然保幼激素酯酶，然后注射到2龄、3龄、4龄幼虫体内，使幼虫在下一次蜕皮时体色变黑，并呈现剂量依赖关系，保幼激素类似物（epofenonane）可以抑制这种体色变黑反应，从而说明体色变黑实验也可以用于测定保幼激素酯酶的生物活性。昆虫保幼激素酯酶在幼虫的特定时间窗内保持相对高的浓度发挥生物功能。试验表明烟草天蛾幼虫末龄期有两个保幼激素酯酶高峰，如果保幼激素酯酶活性受到抑制，幼虫发育历程被打乱，幼虫继续取食（第一保幼激素酯酶高峰）或不能蜕皮（预蛹期保幼激素酯酶高峰）。如果有过多的保幼激素酯酶活性，则导致幼虫减少取食，提早化蛹，甚至死亡。重组保幼激素酯酶注射实验表明，在非特定时间窗内，幼虫体内的保幼激素酯酶被受体介导进入围心细胞（Ichinose *et al*.，1992），然后被降解。烟草天蛾幼虫对保幼激素酯酶敏感的时间窗在头盖线开裂期，此时体色变黑试验最敏感。在幼虫发育的关键时间窗内导入足够的重组保幼激素酯酶来降解幼虫体内的保幼激素，促使幼虫发育成早熟蛹，若如此则表明重组保幼激素酯酶在害虫控制方面将会有巨大的潜力。烟草天蛾的体色变化试验结果表明重组的烟芽夜蛾保幼激素酯酶对烟草天蛾幼虫有生物学活性。

此外，本文作者用家蚕 *Bombyx mori* 幼虫和大蜡螟 *Galleria mellonella* 幼虫进行了早熟发育研究。选用家蚕幼虫进行早熟发育试验，是因为家蚕早熟幼虫可以羽化为成虫，这样可以进一步观察保幼激素酯酶对成虫的生物学行为的影响。选用大蜡螟幼虫，是因为大蜡螟幼虫比较容易获得早熟发育蛹。家蚕和大蜡螟幼虫注射高剂量保幼激素酯酶样品后未观察到早熟发育发生。由于没有其他的检测方法来间接表明重组保幼激素酯酶对这两种幼虫的生物学活性作用，实验方法还有待进一步改进。

致谢 本研究主要在戴维斯加州大学（University of California，Davis）昆虫系Bruce D. Hammock教授实验室完成。Andrew Hinton博士和Beth A. Thomas博士提供实验帮助，在此一并致谢。

参 考 文 献 （References）

Abdel-Aal Y A I，Hammock B D，1986. Transition state analogs as ligands for affinity purification of juvenile hormone esterase. *Science*，233: 1 073–1 076.

Bonning B C，Booth T F，Hammock B D，1997. Mechanic studies of the degradation of juvenile hormone esterase in *Manduca sexta*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*，34: 275–286.

Hammock B D，1985. Regulation of juvenile hormone titer: degradation. In: Kerkut G A，Gilbert L eds. Comprehensive Insect Physiology，Biochemistry，and Pharmacology. Pergamon Press. 431–472.

Hammock B D，Sparks T C，1977. A rapid assay for insect juvenile hormone esterase activity. *Anal. Biochem.*，82: 573–579.

Hammock B D，Bonning B C，Possee R D，Hanzlik T N，Maeda S，1990. Expression and effects of the juvenile hormone esterase in a baculovirus vector. *Nature*，344（6265）: 458–460.

Hanzlik T N，Abdel-Aal Y A I，Harshman L G，Hammock B D，1989. Isolation and sequencing of cDNA clones coding for juvenile hormone esterase from *Heliothis virescens*. Evidence for a charge relay network of the serine esterases different from the serine proteinases. *J. Biol. Chem.*，264: 12 419–12 425.

Ichinose R，Kamita S G，Maeda S，Hammock B D，1992. Pharmacokinetic studies of recombinant juvenile hormone esterase in *Manduca sexta*. *Pestic. Biochem. Physiol.*，22: 893–904.

Jones G，1995. Molecular mechanism of action of juvenile hormone. *Annual Review of Entomology*，40: 147–169.

McCutchen B F，Uematsu T，Szekacs A，Huang T L，Shiotsuki T，Lucas A，Hammock B D，1993. Development of surrogate substrates for juvenile hormone esterase. *Arch. Biochem. Biophy.*，307（2）: 231–241.

Philpott M L，Hammock B D，1990. Juvenile hormone esterase is a biochemical antijuvenile hormone agent. *Insect Biochem.*，20：457－459.

Staal G B，1989. Antijuvenile hormone agents. *Annual Review of Entomology*，31：391－429.

Wroblewski V J，Harshman L G，Hanzlik T N，Hammock B D，1990. Regulation of juvenile hormone esterase expression in the tobacco budworm (*Heliothis virescens*). *Arch. Biochem. Biophys.*，278：461－466.

Zhang D F，2000. Research advances of juvenile hormone esterase. In：Wu K M，Chen X F eds. Research Advances on Entomology. Beijing：China Science and Technology Press. 160－163.［章东方，2000. 昆虫保幼激素酯酶研究进展. 见：吴孔明，陈晓峰主编. 昆虫学研究进展. 北京：中国科学技术出版社. 160－163］